

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-177059

⑬ Int. Cl.⁴
G 01 N 33/48識別記号 庁内整理番号
D-8305-2G

⑭ 公開 昭和63年(1988)7月21日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全12頁)

⑮ 発明の名称 血液分離装置及び方法

⑯ 特 願 昭62-270484

⑰ 出 願 昭62(1987)10月28日

優先権主張 ⑱ 1986年10月29日 ⑲ 米国(US) ⑳ 924633

㉑ 発 明 者 ロバート エス. ヒル アメリカ合衆国, カリフォルニア 95014, クーパーティ
マン ノ, マジエステイツク オーク ウェイ 22774

㉒ 発 明 者 イアン ギボンズ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94025, メンロ パー
ク, フリーモント ストリート 1003

㉓ 出 願 人 バイオトラック, イン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94043, マウンテン
コーポレイテッド ビュー, ハフ アベニュー 1058

㉔ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

血液分離装置及び方法

2. 特許請求の範囲

1. 装置の入口部から反応領域への毛管通路を
通って液体が移動するための駆動力が毛細管圧に
より生ずる臨床診断装置であって、該通路に低圧
フィルターが挿入されており、該フィルターが、
(1) 約1.2 μ m ~ 約2.8 μ m の範囲の粒子サイズ保
持及び約0.25 ~ 2.0 μ m の範囲の流路を有するガラ
スマイクロファイバーフィルター、並びに(2)
凝集した赤血球から血漿を分離することができ、
これによって前記入口部に適用された全血がフィ
ルターにより血漿と赤血球とに分離される該フィ
ルターから成る群から選択されるものであること
を特徴とする改良された装置。

2. 前記フィルターが珪酸ガラスフィルター
から本質的に成る特許請求の範囲第1項に記載の
装置。

3. 前記フィルターがバインダー不含有ガラス

マイクログラスファイバーフィルターである特許請求の
範囲第1項に記載の装置。

4. 前記ファイバーが0.5 ~ 0.9 μ m の厚さ、及
び約1 ~ 3 μ m の粒子サイズ保持を有し、そして
0.10 ~ 4.0 μ m の実質的にすべての範囲に直径を有
するガラスファイバーを含んで成り、該ファイバ
ーの少なくとも60%が0.10 ~ 1.23 μ m の範囲の直
径を有する、特許請求の範囲第3項に記載の装置。

5. 前記装置が赤血球に対する凝集素を含有し
ない、特許請求の範囲第4項に記載の装置。

6. 前記装置がさらに、前記フィルター中に又
は前記液体と該フィルターとが接触する前記通路
に先立って存在する可溶性凝集素を含んで成る
特許請求の範囲第1項に記載の装置。

7. 前記凝集素が抗体である、特許請求の範囲
第6項に記載の装置。

8. 前記フィルターがガラスファイバー、紙、
又は多孔性膜を含んで成る特許請求の範囲第7項
に記載の装置。

9. 前記フィルターが直径6 μ m 以上の粒子を保

持することができる紙を含んで成る特許請求の範囲第7項に記載の装置。

10. 赤血球から血漿を分離するための方法であって、

全血を低圧フィルターの表面に適用し、ここでこのフィルターは(1)約 $1.2\mu\text{m}$ ～約 $2.8\mu\text{m}$ の範囲の粒子サイズ保持及び約 $0.25\sim 2.0\mu\text{m}$ の範囲の流路を有するガラスマイクロフィルターファイバー、並びに(2)凝集した赤血球を血漿から分離することができ、~~これにより~~^{この場合}全血が前記フィルターとの接触と同時に又はそれに先立って凝集素と接触するフィルターから成る群から選択され、

前記血液を適用するための入口部及び前記血漿を集めるための出口部を有する密閉された容器中で上記作用が行われ；そして

前記フィルターの第二の表面との接触から毛管によって血漿を除去し、この場合前記血漿の除去のために使用される力が前記毛管の毛細管作用により与えられる；

ことを特徴とする方法。

項に記載の方法。

17. 前記フィルターが、 $6\mu\text{m}$ 以上の直径を有する粒子を保持することができる紙を含んで成る特許請求の範囲第10項に記載の方法。

18. $50\mu\text{m}$ 以下の全血を前記フィルターに適用する特許請求の範囲第10項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、濾過により血液から血漿を分離するための技法及び装置に関し、そして特に低圧での濾過に向けられる。

(従来の技術)

多くの診断が臨床分野においてサンプルとして血液を用いて行われる。これらの技法の幾つかは全血に対して行うことができるが、正確な結果を得るためには多くの場合血漿又は血清をサンプルとして用いる必要がある。例えば、赤血球は光散乱しそして吸収し、そして光の反射又は透過の測定に頼る診断試験の散乱光又は透過光の測定に不

11. 前記フィルターが結合剤不含有ガラスマイクロファイバーフィルターである特許請求の範囲第10項に記載の方法。

12. 前記フィルターが $0.5\sim 0.9\mu\text{m}$ の厚さ及び約 $1\sim 3\mu\text{m}$ の粒サイズ保持を有し、そして $0.10\sim 4.0\mu\text{m}$ の実質的にすべての範囲に直径を有するガラスファイバーを含んで成り、該ガラスファイバーの少なくとも60%が $0.10\sim 1.23\mu\text{m}$ の範囲の直径を有する、特許請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 前記方法が赤血球に対する凝集素を含有しない特許請求の範囲第12項に記載の方法。

14. 前記方法がさらに、前記フィルター中で又は該フィルターと全血との接触に先立って可溶性凝集素を前記全血と接触せしめることを含んで成る、特許請求の範囲第10項に記載の方法。

15. 前記凝集素が抗体である特許請求の範囲第14項に記載の方法。

16. 前記フィルターがガラスファイバー、紙、又は多孔質膜を含んで成る特許請求の範囲第15

都合な影響を与えるであろう。

従来より、血漿及び血清は凝血の前(血漿のため)又は後(血清のため)に遠心分離することにより全血から分離されている。しかしながら、遠心分離は時間を必要とし、そして臨床試験室外では一般に使用されない装置を必要とする。従って、血清又は血漿を必要とする多数の血液物質のフィールド試験は困難である。

この問題を回避するために多くの技法が工夫されている。これらの技法においては一般に、血漿から赤血球を分離することができる濾過装置が使用される。フィルターを形成するため、過去において多くの材料が使用されてきた。紙、不織布、粉末又はファイバーから成るシート状材料、例えば人造繊維又はガラスファイバ、及び適切な孔サイズを有する膜フィルターが提案されている。例えば、コンドウ等の米国特許No. 4,256,693は、血液に使用するための多層一体化化学分析要素中の多数のフィルター材料を開示している。Vogel等の米国特許No. 4,477,575は、ファイバーを他の吸

着相と組合わせて全血から血漿又は血清の分離を可能にする組成物及び方法を開示している。

しかしながら、これらの従来技術は、空間及び体積の制限のために、1滴の血液が分離されそして血漿が毛細管作用によってのみ装置内を輸送されるような装置中で小フィルターのみを使用することができる用途での使用のためには適当でないことが証明されている。従って、血液分離技法の一層の洗練が望まれる。

(発明の概要)

血漿から赤血球を分離する装置及び技法が提供され、これらにおいては、フィルターの出口面から血漿を輸送するための駆動力が毛細管作用によってのみ提供される条件下で全血サンプルがフィルターに適用される。2つの基本的な濾過技法を用いることができる。第一の技法においてはガラスマイクロファイバーフィルターが用いられそして赤血球凝集素を使用する必要がない(所望により凝集素を使用することもできるが)。第二の技

法においては凝集素を使用する必要があるが、しかし広範囲の種類のフィルターを用いることができる。

ガラスマイクロファイバーフィルターは、赤血球よりも血漿が速くフィルターを通過するように粒子サイズ保持 (particle size retention) 及び厚さに基いて選択され、この場合赤血球のフィルターへの通過はクロマトグラフィーカラム中で生ずるのと同様な態様で妨害される。赤血球細胞は最終的にはフィルターを通過するが、血漿が分離しておりそして毛細管作用によって反応室に通じ、赤血球による妨害を伴わないで血漿中に存在する分析対象を分析することが可能となる。凝集素を使用する場合、フィルターは凝集した赤血球を血漿から分離することができる任意のフィルターであることができる。しかしながら、両方の技法は、小容量の血液及び毛管装置中で血液を輸送するために使用され得る低圧を伴う使用のために特に適合される。

以下余白

(具体的な説明)

この発明は、1985年8月5日に出願された米国出願No. 762,748の一部継続出願である1986年7月1日に米国出願No. 880,793明細書中に詳細に記載されている毛管流装置において行うことができる。これらの先行出願中に記載されている毛管流装置は、毛管、室、及び流体を輸送するためのオリフィス; 流体、反応時間、及び試薬の混合の測定を制御すること; 並びに検出可能なシグナルを測定することに基づく。毛管が、装置にわたって液体を移動せしめるための唯一の駆動力を提供する。

前記のようにこれらの装置は全血と共に使用することができようが、血清又は血漿と共に用いる場合、血清又は血漿を装置に適用するに先立って赤血球を分離しなければならない。この発明は、全血をこれらの装置に、又は流体の移動のための駆動力を得るために毛細管作用に頼る他の任意の装置に直接適用することを可能にする。ガラスファイバーフィルター、又は凝集素とこの明細書中

に記載するガラス製もしくは非ガラス製フィルターとの組合わせを選択することにより、非常に小さな空間中で、最少の細胞溶解を伴って、そして血清又は血漿を反応室に移動させるために毛細管作用により提供される力以外のなんらの追加の力の適用を必要としないで、所望の分離を達成することが可能である。

この発明の1つの有用な観点は血漿からの赤血球の分離がフィルター材料の単一層及び小容量の血液を用いて達成され得ることである。大規模に血液を分離するために使用される従来技術の材料及び/又は吸収層を伴う多層フィルターの使用はこの発明の分離条件のもとでは有用でないことが証明されている。

この発明の第一の態様の主要部はガラスファイバーフィルターである。特に適当なガラスファイバーフィルターは珪酸ガラスのファイバーから製造することができ、この材料は二酸化珪素に加えて約10%の三酸化珪素、並びにアルカリ金属及びアルカリ土類金属の酸化物並びに鉄、アルミ

ニウム及び亜鉛のごとき他の金属の酸化物を含有する。しかしながら他のガラスを使用することもできる。

この発明のガラスファイバー濾過媒体の製造においてはマイクロガラスファイバーが使用される。これらは、引き出されたガラスフィラメントから作られたスパンガラス材料とは異り、ジェットを介してガラスを吹き出すことにより典型的に形成された非常に細いファイバーである。典型的には、ガラスファイバーフィルターは $0.10 \sim 7.0 \mu\text{m}$ の直径を有するファイバーから調製される。

しかしながら、この発明の実施において有用なガラスファイバーフィルターを製造するためにはこの直径範囲内に存在するファイバーの分布を調節することが重要である。最少の大直径ファイバーを伴う狭い範囲の微細ファイバーを使用すべきである。

好ましいフィルターは $0.10 \sim 1.23 \mu\text{m}$ の直径を有するファイバー60%、好ましくは80%又はそれ以上を有すべきであり、そして $1.23 \mu\text{m}$ より大き

い直径を有するものを40%より多くそして好ましくは20%より多くを有すべきでない。実質的にすべてのファイバーが $4.00 \mu\text{m}$ 未満の直径を有するフィルターが好ましい。

他方、ファイバーのサイズの範囲は上記の限界内であまりに小さくあるべきではない。 $0.10 \sim 1.23 \mu\text{m}$ の範囲で直径が比較的均一に分布していることが好ましい。ファイバー直径が非常に狭い範囲にある($0.14 \mu\text{m}$ の全範囲にわたって変化する)場合、正しいファイバー作用が得られないことが明らかになった。従って、もし $0.10 \sim 1.23 \mu\text{m}$ の範囲を2~5、特に3又は4に等分するとすればおよそ同数のファイバー(好ましくは本数の%の差異が10%未満である)が各区分に属する(例えば、直径範囲を3等分する場合、40, 30, 30; 30, 40, 30; 又は35, 30, 35の本数比)ように異なる直径のファイバーの分布を用いるのが好ましい。

適当なファイバーシートは、湿潤パルプ中ガラスファイバーの混合物を製紙機中に適用することにより製造することができる。ある場合には、少

量の高ポリマー有機バインダーを使用することができるが、このようなバインダーは好ましくない。典型的なバインダーとしてセルロース性又はアクリル性のポリマーが挙げられる。

この発明の実施において使用されるガラスファイバーフィルターは深フィルター(depth filter)として知られており、そして不規則に濾過するファイバーから構成されている。主として粒子の機械的保持(retention)の結果として分離が得られる。ファイバーのサイズ及び形状の両者が不規則であるため、このようなフィルターにおける絶対的な孔サイズを与えることは困難である。フィルターは一般に「保持」に基いて分類され、この「保持」は水性液又は他の液から所与のサイズの粒子を除去するフィルターの能力を定義するものである。

ガラスファイバーの選択において、粒子サイズ保持、ガラスの組成、厚さ、及び密度を考慮に入れて、溶血を伴わないで適切な濾過を得るべきである。 $0.5 \sim 0.9 \mu\text{m}$ の厚さが好ましく、 $0.50 \sim$

$0.80 \mu\text{m}$ の厚さがさらに好ましく、 $0.66 \sim 0.76 \mu\text{m}$ の厚さが特に好ましい。わずかにアルカリ性(pH 8.0~11.0、好ましくは約9.0~10.5)の硼珪酸ガラス又は他のガラスが好ましい。粒子サイズ保持は好ましくは約1.0~3.0ミクロンであり、さらに好ましくは1.4~3.0ミクロンであり、そして最も好ましくは2.3~3.0ミクロンである。 $0.10 \sim 0.30 \text{ g/cm}^3$ の範囲の密度が好ましく、 $0.20 \text{ g/cm}^3 \sim 0.28 \text{ g/cm}^3$ がさらに好ましく、約 0.25 g/cm^3 が最も好ましい。硼珪酸ガラスのおよその密度が 2.61 g/cm^3 であるから、密度はガラスフィルターの多孔度(porosity)の目安である。

上記の数値は硼珪酸ガラスフィルターについて与えられる。粒子サイズ保持及び厚さは他のタイプのガラスについても同じであろうが、フィルターの密度は選択される各ガラスの密度に比例して異なるであろう。

この発明の実施において多数の商業的に製造されたガラスフィルターを使用することができる。例えばマイクロ・フィルトレーション・システム

ス (Micro Filtration Systems ; MPS) は、使用することができそして製造番号 GA-200、GB-100R 及び GC-90 として特定される 3 種類のガラスファイバーフィルターを製造している。この発明の実施において GB-100R 及び GC-90 が二重フィルターとして使用される。GA-100 は約 0.25 g/cm^2 の密度、 0.70 mm の厚さ、及び液体を濾過する場合 2.3 ミクロン保持サイズを有する。2 倍の厚さの GB-100R は 0.25 g/cm^2 の密度、 0.76 mm の厚さ、及び 2.0 ミクロンの粒子サイズ保持を有する。二重層の GC-90 は 0.30 g/cm^2 の密度、 0.66 mm の厚さ、及び 1.7 ミクロンの粒子サイズ保持を有する。

クリフトン、ニュージャーシーの Whatman 社及び西独の Schleicher & Schuell 社は多数の異なるガラスマイクロファイバーフィルターを製造している。しかしながら、試験された Whatman 社のフィルター及び Schleicher & Schuell 社のフィルター (Whatman GF/C、GF/B、GF/D、GF/F、934-4H ; S+S3362) はこの発明の目的のために有用でないことが明らかにされた。これらの膜の

製造に使用されるガラスファイバーのサイズの分布の相違及び赤血球保持に対する効果のためである。他のガラスファイバーフィルターも試験され、そして適切な分離をもたらさないことが明らかにされた。これらのフィルターは (Nucleopore、ブリーサントン、C A、からの P300 (有機バインダーを含む) ; Hollingsworth & Vose、イーストワルポール、M A、からの HB-5341 及び BG-08005 ; Eaton-Dikeman、カールアイル、P A、からのガラスファイバーフィルター 111, 121, 131, 141, 151 及び 161 ; 並びに Machery & Nagel、ドゥレン、西独、からのガラスファイバーフィルター 85/90 F である。

上記の製造されたガラスファイバーのすべて (特に記載したものを除く) が有機バインダーを用いないで製造されている。有機結合剤は孔サイズを小さくする傾向があり、そして赤血球がフィルターを通過する際に該赤血球と相互作用する傾向がある。従って、バインダーを含まないガラスフィルターが好ましい。しかしながら、同じ粒サ

イズ保持をもたらすファイバーサイズ及び密度を選択することによりガラスフィルター中にバインダーを使用することが可能である。さらに、下記するごとく、凝集素を使用する場合には記載された厳格な調節を維持する必要がない。

その唯一の駆動力が毛細管作用である装置を用いて、血清から血漿を分離する能力について多数の異なるタイプのフィルターを試験した。試験されたすべてのフィルター内、上記のファイバー直径分布を有するバインダー不含有ガラスファイバーフィルターが最良の分離を与える。毛細管作用により生ずる差圧は、大サンプルに対する重力の作用の結果として、又は米国特許 No. 4,477,575 中に記載されている μ タイプのガラスフィルターと吸収パッドとの接触の結果として存在する差圧に比べて見かけ上有意に低い。典型的には、利用される圧力は 2.5 mmHg (34 mmHg) 以下のオーダーである。

約 $7 \sim 10 \mu\text{l}$ の体積を有するバインダー不含有ガラスマイクロファイバーフィルターは、 $25 \mu\text{l}$

の血液が適用された場合約 $3 \sim 4 \mu\text{l}$ の血漿をもたらす。後で詳細に記載する第 1 図に示すような装置中でフィルターを用いた場合、フィルターに全血液を適用して約 5 秒間の後、フィルター口出部の頂部に血漿が現われる。適用の約 12 秒間後にウエル中に血漿が現われる。血球は最終的にはフィルターを通過し、血球はブロックされないが妨害され、適当な分析を行うのに十分な血漿がこの時間までに現われる。このタイプのフィルターは 33~60% の範囲のヘマトクリットを含有する血液を濾過するのに有用であることが示された。フィルター体積に対する得られる血漿の比率は、同じフィルター厚を維持しながらより大きな直径のフィルターを用いることにより上げることができる。

赤血球に対する抗体又は他の凝集素をフィルターと組み合わせて使用する毛管流装置中で 1 滴の血液中の赤血球から血漿を分離することも可能である。フィルターは前記のガラスファイバーフィルター (凝集素の不存在下では機能しないフィルターを含む)、紙、又は凝集した赤血球を濾過す

ることができる任意の他のタイプのフィルターのいずれであってもよい。紙、不織布、粉末又はファイバーから成るシート状フィルター材料（例えば炭素又はガラスファイバー）、及び適当な孔サイズを有する膜はいずれも抗体及び他の凝集素と共に使用することができる。セルロースファイバー、綿リントー、ニトロセルロース、木材パルプ、 α -セルロース、硝酸セルロース、及び酢酸セルロースはいずれも許容されるフィルター及び／又は膜を製造するために適当である。

凝集素はフィルター中に（可溶性の形態で）存在することができる、又は濾過に先立って血液サンプル中に添加する（例えば、全血サンプルを、フィルターに接触せしめるのに先立って、可溶性凝集素を含有する毛管又は他の室に通すことにより）ことができる。赤血球の凝集を惹起することができる任意の化学的又は生化学的試薬を使用することができる、これらには抗体及びレクチンが含まれるがこれらに限定されない。この様な凝集素は化学分析の分野においてよく知られている。特に無

稀釈の全血と共に使用する場合、抗体が好ましい凝集素である。しかしながら、他の可溶性凝集素も赤血球の直接及び間接凝集のために満足すべきものである。例えば、Stites等、Basic and Clinical Immunology、第4版、Lange Medical Publications、ロサンゼルス、カリフォルニア(1982)、356-359頁を参照のこと。

使用される抗体は赤血球の表面上に存在する決定基に対する結合親和性を有するであろう。血液抗原と反応する特異的モノクローナル抗体、例えばタイプ-A抗原と反応する抗体が使用される場合、使用されるフィルターに血液タイプを一致せしめることが必要であろう。赤血球の表面上に存在する任意の抗原と反応する抗体を使用することができる、このような抗原には主要組織適合性抗原、細胞表面蛋白質、細胞表面炭水化物、及び細胞表面糖蛋白質が含まれるが、これらに限定されない。

試験される種のすべての赤血球と反応する混合抗体源を用いるのが好ましい。例えば、ヒト赤血球に対する抗血清、又は主要血液タイプのすべて

と反応するモノクローナル抗体の混合物を使用することができる。この様な抗体は商業的に入手可能である。例えば、ラビット抗-ヒト赤血球抗体のIgG画分をCooper Biomedical(ウエストチェスター、PA)から得ることができる。フィルターを製造するために使用される固体の表面に抗体を吸着せしめることができる。紙フィルターの場合、抗体を含有する水溶液に紙を単に接触せしめそして次に蒸発によって水を除去することにより抗体を紙に効果的に吸着せしめることができる。所望により、抗血清をそのまま適用することができる又はそれを稀釈することができる。濾過が効果的であるためにフィルターに適用されなければならない抗体の最少量が一般に存在する。この最少量より少ない場合、赤血球は速すぎる速度でフィルターを通過する。しかしながら、抗血清が異れば赤血球を結合するそれらの能力が異なるであろうから、フィルターに適用しなければならない抗血清の特定の量を与えることは不可能である。従って、抗体の最適量は経験的に決定される。抗体含

有溶液又は抗血清の一連の2倍稀釈物がフィルターを飽和するのに十分な量でフィルターに適用される。濾過効率、赤血球の溶解、及び標準量の全血が適用された場合にフィルターを通過する血漿の量が測定される。Cooper Biochemicals社からのラビット抗-ヒト赤血球抗体のIgG画分を使用した場合、溶液を再構成して30mg/mlの蛋白質及び20mMリン酸緩衝化塩溶液(pH7.3)とした。良好な濾過のために必要であると考えられるこの溶液の最少量は7.5 μ lであった(フィルター直径0.18インチ、S+S GB003紙を使用;フィルター体積は約10 μ lであった)。しかしながら、抗体を無稀釈溶液として適用する必要はなかった。効率的な濾過を行うために1:10の稀釈がなお有効であった。従って、フィルターを飽和するために必要な溶液の体積(1:10稀釈において10 μ l)は高力価の抗体を与えるのよりも重要である。直径0.180インチ及び体積約10 μ lの濾紙ディスクを使用する場合、該ディスクを飽和しそして抗体をフィルター全体に均一に分布せしめる

ためには5 μ 以上、そして好ましくは7.5 μ 以上の溶液が必要なようである。他のフィルター体積について類似の体積比(0.15:1及び0.75:1)が効果的であろう。抗体の均一な分布により、赤血球が他の部位では捕捉されるのにある部位ではフィルターを通過することが回避される。

フィルターとの接触に先立って抗体がサンプルに添加される場合、溶血を抑制することができる試薬の存在下で濾過を行うのが好ましい。典型的な抑制剤として、局所麻酔剤、例えばジブカイン及びリドカイン； β -アンドレン作動遮断剤(β -adrenergic blocker)、例えばプロパノロール；三環抗抑制剤、例えばクロロプロマジン及びアニトリプトレイン；並びに3-ヒドロキシビリジン、例えば3-ヒドロキシ-6-メチルビリジンが挙げられる。

血漿又は血液(後者は、血漿から赤血球を分離しない裸の濾紙又は他の材料を使用する場合)の通過速度を調節するために、抗体と共に又は抗体を伴わないでフィルターを用いることができる。

試験装置において使用された。この記載を引用によりこの明細書に組み入れる。(1)小容量の血液及び(2)血漿の動きを生じさせるための毛細管作用を用いる装置の残りの部分との組み合わせにおいてフィルターがいかに使用されるかを示すために、これらの装置の簡単な記載を含める。

下記の実験的研究の多くにおいて使用される試験装置を第1図に示す。この装置は、顕微鏡スライドとおおよそ同じサイズ及び形状の3枚のプラスチック片及び両面テープから製造された。上部スライド10は、使用されるべきフィルターより小さい直径を有しスライド10を完全に貫通している穴10、及び両面テープ14を有する。このテープは示されている具体例においては上部スライドの全長にわたって伸びていないが、所望により全長にわたって伸びていてもよい。中間スライド20は該スライド20を完全に貫通する穴22及び両面テープ24を有し、このテープはスライド20の底面に適用される。両面テープ24は該テープから切り取られた部分26を有し、全装置が

フィルター上の抗体量の増加により、血漿の先端が毛管路にそって所定の位置に達するのに要する時間がのびる。フィルター及びフィルターに続く毛管はそれぞれ装置を通過しての流体の流れに対抗する位置として作用する。實際上、それぞれは流体の流れにおけるバルブとして機能する。フィルターを通しての流体の通過が毛管を通しての流れより大きな抵抗にあう場合、この系は、第一のバルブが部分的に閉止されておりそして流体流中の第2のバルブが開いているかのごとく機能する。しかしながら、毛管中により大きな抵抗が存在するように毛管流速を変化せしめることができる。このような系は、第一のバルブが開いておりそして第二のバルブが部分的に閉止されているように機能する。フィルターの厚さ及び密度を変えることにより、そして適当な毛管直径を選択することにより、系を通る流体流のかんりの調節を達成することができる。

上記のようなフィルターが米国特許出願No. 880,793及び762,748明細書中に記載されている

集成された場合に毛管チャンネル及び室を提供する。毛細空間26Aはフィルターを保持する穴22から反応室26Bに延びる。追加の毛管室26Cが、反応室からテープの縁に伸びることにより排出口を提供する。底部スライド30は平らなスライドであって、このものはフィルター、毛管、及び中間スライド20とテープ24とで形成される試薬空間の底面を形成する。

組み立てられた装置を第1図Cに示し、この図中の点線は形成されている内部室を示すために用いられている。血液は入口部(穴)12に適用され、室22中に保持されたフィルターと接触し、そして血漿と赤血球に分離され、赤血球はフィルター上に残る。血漿は毛管26Aを通過して反応室26Bに移行し、他方空気は毛管排出口26Cを通過して排出される。

第2図は2個以上のプラスチック片を溶着して内部室を有する1つの装置を形成することにより製造した装置を示す。この装置の多数の具体例が前に引用した米国特許出願No. 880,793及び762,748

中に記載されている。フィルター46を含む室44より小さい直径を有する入口部42に血液が適用される。血漿はフィルターの底部から収集空間48に出、そして毛管50により反応室52に輸送される。装置から空気を排出するために排出口54が設けられる。入口部への血液の適用を助けるため所望により峰56を設けることができる。前記特許出願明細書中に記載されているような追加の毛管、室、排出口等が装置40に存在することができるが、明瞭にするためこの図においては省略されている。

場合によっては抗凝固剤の添加により又は測定される分析対象との反応を行うためもしくは血液の採集のために有用な他の試薬の添加により配合された全血サンプルが試験装置の受理ユニットの入口部に導入される。受理ユニットは毛管であることができ、又はさらに大きな室であることができる。受理ユニットは特定のサンプル容量を測定するために使用することができ、又はサンプルを単に受理しそしてサンプルをフィルターに向ける

フィルターは所望によりさらに多孔質であることができるが、しかし少数の細胞については6~10 μ mから多数の細胞については0.1 μ m(100 μ m)以上の見かけ直径を有する細胞塊を典型的には構成する凝集した赤血球を保持すべきである。

血漿は通常、それがフィルターを離れるに従って、1又は複数の毛管により取り上げられるであろう。血液がフィルターの頂部に適用される場合、血漿が底部から収集されるであろう。フィルターの側部は壁に密接に接触しており、赤血球がフィルターの縁の周りを通過するのが防止される。場合によっては、フィルターの側部に封止剤を使用することができる。フィルターの底部を離れる血漿は、フィルターの底部と密着する該フィルターを収容する装置の表面と該フィルターとの間の溝又は他の空間に集ることができる。毛管が1又は複数の収集空間から血漿を引き出すであろう。ここで使用する上部、底部及び側部なる用語は相対的な意味であり、そして地球表面に対するフィルターの方向を必然的に記載するものではないこと

ために用いることができる。全血がフィルターに接触するとき、これが前記のようにその成分に分離される。フィルターから離れるべき第一成分は、サンプルの由来に依存して血漿又は血清であろう。この検討においては血漿なる用語を用いるが、しかしこれは血漿又は血清のいずれかを意味するものと理解すべきである。

この発明のフィルターは典型的には多層ではなく材料の単層から成る。これらは、典型的には30~50 μ l又はこれより少ない体積を有する一滴の血液を分離することが意図される。従って、フィルターの体積も小さく、血漿のすべてを吸収しそして保持するのを防止するため5~20 μ lの範囲である。厚さ(すなわち、流れの方向に測定した長さ)は好ましくは0.2~1.5mmである。この範囲はすべてのフィルターについてのものであり、そしてそれ故に前記のガラスマイクロファイバーフィルターについて示したものよりも幾分広い。ガラスマイクロファイバーフィルターの粒子サイズ保持は前に検討した。凝集素と共に使用されるフ

が認識されよう。毛管は通常約0.01mm~2mmの範囲の直径を有する。毛管の長さは非常に多様であるが、しかし一般に10cmより短かく、通常約5cmを超えないであろう。

第一毛管は、反応室として通常機能するであろう室への流速を調節することができる。すなわち、毛管は、該毛管及び/又は反応室の壁に結合しているか又はその中に含まれる試薬と接触する時間の調節を助けることができる。しかしながら、フィルターを通る血漿の流速は上記のように多くの場合限定されており、毛管はしばしば血漿がフィルターを離れると可及的に早く血漿を輸送する。試薬が色の変化を与えるか、又は血漿中に存在する分析対象の量を決定するための他のなんらかの手段を提供する。

毛管は、サンプルがフィルターを通過した後液体が装置内を移行するための唯一の駆動力を提供する。毛管、反応室及び水平面方向の他の室を有する装置が通常使用され、重力は流速に影響を与えない。装置は補助駆動力、例えばポンプ、重力

等を伴わないで用いられる。従って、毛細管力が装置を通して血漿を輸送することを可能にしながら分離を達成するために、この明細書に記載したようなフィルターを選択することが必須である。重力に助けられるか又はフィルターと接触する吸収剤により惹起される比較的大きなウィッキング(wicking)力に依存して大容量の血液を分離するために米国特許№ 4,477,575及び 4,256,693のごとき従来技術中に記載されているフィルターは、この発明において使用される型の毛管流装置においては有効でないことが、実験的証拠により示された。

この明細書に記載されるフィルターは前記と同じ装置中で使用することができるが、ガラスファイバーフィルターと共に使用するための好ましい装置の配置を第3図に示す。この装置においては、血液分離器として設計されたフィルター上に配置された入口部42'に全血が適用される。血漿を反応領域に移送するため血液分離器の周辺に多数の毛管(50')が配置されている。毛管は異なる長

さ及び直径を有するが、各毛管から実質的に同時に血漿が試薬領域52'に達することができるように設計されている。米国特許出願№ 880,793は、この効果を達成するためのサイジング(sizing)毛管を記載している。この設計は試薬領域の均一且つ迅速な充満を可能にする。

次に、特定の例によりこの発明をさらに具体的に説明するが、これによってこの発明の範囲を限定するものではない。

例1

材料及び方法

血液：次の実験において、15USP ユニット/mlのリチウムヘパリン中全血を使用した。

フィルターディスク：0.180"パンチを用いて市販のフィルター又は他の記載されている材料からフィルターディスクを作った。

溶着されたカートリッジ

ABS(アクリリアミド-ブタジエンスチレン)スライドをブランソン超音波溶接器により次の設定値：圧力=60psi、溶接時間=0.3秒、

保持時間=1.5秒、ダウンスピード=3.0で溶着した。

装置の必須部分は、厚さ33.5ミル、合計容積16 μ lのフィルター、厚さ3.3mmの連結室(通常の毛管より広い)、及び排出口を有する反応室であった。連結室及び反応室の合計容量は8.5 μ lであった。

テープスライド：アセテートプラスチックストリップ(6"×1")をスパーククリーン溶液中で洗浄し、脱イオン水ですすぎ、そして糸クズを有しないタオルを用いて乾燥した。次に、プラスチックストリップを2.5"×1"のスライドに切断した。血漿と接触するプラスチック表面を組立てに先立ってプラズマ食刻器により食刻した。上部スライドは、該スライドの底部に付着した二重粒着テープを有するきれいなプラスチック片であった。テープから切り取られた毛管及び他の内部室を形成したパターンを有する3.5ミルの両面粘着スコッチ名柄テープを中間スライドとなるものの底部に付着した。#16ドリル(0.173")を用い

て穴をあけてウェルを形成した。#25ドリルを用いてこのカバースライド中に排出穴をあけた。上部ストリップを注意深く整列した穴を有する中間ストリップの上部に付着せしめた。次に、選択されたフィルターを中間スライドのウェル中に置き、そして底が食刻されたスライドを中間スライドのテープに付着せしめた。フィルターは底部スライドの上面に対して同じ高さであった。完成したスライドを第1図に示す。

溶血の測定：血漿による570nm光の吸収を測定することにより溶血の%を定量した。吸収はヒューレット-パッカード8451A分光光度計上で測定した。約0.01cmの光路を有するセルを用いて読みを取った。0.01cmの光路は上記のようにして調製したテープカートリッジのものである。吸収を換算定数で乗ずることにより、吸収を溶血%に換算した。0.01cmの光路のセルのために570nmのピークを使用し、そして換算定数は42.0であった。

ガラスファイバーフィルター：多数のガラスファイバーフィルターを試験した。これには、他の

フィルターが特定されない限りすべての例において使用したフィルターである、マイクロフィルトレーションシステム(MFS)からのGA-200が含まれる。GA-200は0.5~1.0マイクロメートルの範囲の典型的な直径を有するガラスマイクロファイバーを含有する不織ガラスファイバーフィルターである。このフィルターは0.70mmの厚さを有し、そして液相中で直径2.3 μ mの粒子を保持した。フィルターの密度は0.25g/cm³である。密度及び厚さは、毛管装置を組み立てる過程で行われるわずかな圧縮に先立って測定される。

結果

鎌形赤血球貧血を有する患者からの血液、人工的に生じさせた高ヘマトクリット及び低ヘマトクリットの血液、並びに正常血液をGA-200フィルターを通して濾過して、異常なヘマトクリットの血液が効果的に濾過されるか否かを決定した。

以下余白

常ヘマトクリット血を濾過するのに効果的であることが明らかであり、確かに、低ヘマトクリット血液は正常又は高ヘマトクリット血より速くフィルターを通して流れるようである。

低ヘマトクリット血はより効果的に濾過された。すなわち、赤血球より前に、血液の体積当りより大体積の血漿がフィルターを出た。しかしながら、血漿試験を可能にするのに十分な血漿が高ヘマトクリット血においても分離された。

MFSからのフィルターの比較

マイクロフィルトレーションシステム(MFS)からの種々のフィルターを、血漿から赤血球を濾過するための能力について試験した。MFSフィルターの名称はそれらの物理的性質に基く。名称中の第二の文字がアルファベット中で後になるに従ってフィルターの織りが緻密になり、そしてフィルターを通る流れが遅くなる。名称中の番号はフィルターの厚さに対応する。すなわち、番号が大になるに従ってフィルターが厚くなる。試験した群からの3つのフィルター、すなわちGA-

血液タイプ	濾過	時間1*(秒)	血球溶解(%)
鎌形細胞	+	<5	0.80
HCT=30	+	<5	-

血液タイプ	濾過	時間1*(秒)	時間2*(秒)	体積**(μ l)
鮮血				
HCT=48.5	+	4	12.6	2.5
	+	5	13	2.5
HCT=33.0	+	4	8.9	5
	+	5	12.7	5
HCT=60.0	+	4	13.2	2.5
	+	8	27	2.5
	+	7	12	2.5

* 時間1は、フィルターへの血液の添加からフィルターから赤血球が出るまでの時間である。
時間2は、血液が試薬ウエルの始めに達するための時間である。

** 体積は、赤血球がフィルターを出る前にフィルターを出る血漿の体積である。

このフィルターが、正常血液の場合と同様に異

200、相互に重ね合わせた2枚のGB-100R、及び相互に重ね合わせた2枚のGC-90、は満足できるものであった。

フィルター	時間1(秒)	時間2(秒)	体積(μ l)	血球溶解*(%)
GA-200	5.0	12.8	4	0.58
GB-100 \times 2	19	32	5	0.95
GC-90 \times 2	-	120	5	-

* 遠心による赤血球の除去後に測定した細胞血球溶解=0.37%。

ガラスファイバーフィルターに暴露した後の分析対象の回収

この実験の目的は、潜在的な分析対象がガラスファイバーフィルター材料に吸着されるか否かを決定することであった。試験された分析対象はコレステロール、カリウム、及び全蛋白質であった。実験は次の方法を用いて行った。

1. 血液をVacu-tainerチューブに引き込み、

血液を遠心チューブに移し、血液を室温にて20分間放置し、そして次にTRIAC遠心機(クレイアダムス)上で血液設定において5分間遠心することにより血清を得た。

2. 次にサンプルを分けて、1つのサンプルをガラスファイバーフィルター材料に接触せしめ、そして他方を実験室分析までそのまま置いた。

3. テープスライド中のフィルターディスクの体積は12.6 μ lであった。50 μ lの血液をフィルターに加えると仮定して、フィルター体積に対する血液体積の比率は約4であった。この実験においては2mlの血清を全体積317 μ lを有する直径24mmのディスク(厚さ=0.7mm)と接触せしめた。この実験において血液/フィルター体積比は2000/317=6.3であった。

4. フィルターを含むサンプルを中間速度で約20秒間渦動せしめ、そして次にTRIAC遠心機中で5分間回転してガラスフィルターを沈降せしめた。血清をガラスピペットを用いて吸い出した。次に血清を分析した。

	フィルター 無し	フィルター 使用	回収率
コレステロール (mg/dl)	157	158	1.01
カリウム (mEq/ml)	4.2	4.2	1.00
全蛋白質 (mg/dl)	7.2	7.1	0.99

カリウム、全蛋白質、及びコレステロールの結果は、フィルターとの接触の後、これらの分析対象がほとんど回収されることを示している。

この明細書中に引用した刊行物及び特許出願は本発明が属する分野の技術水準を示すものであり、これらが引用された場所に引用により組み入れられる。

以上、本発明をいく分詳細に記載したが、これらは例示的なものであり、本発明の範囲内において多くの変更が可能であろう。

4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明のフィルターを含む装置の1つの態様を示し、この装置により多くの例が実施

された。図中、aは拡大側面図であり、bは最終装置を形成する各構成部品の底面図であり、そしてcは組み立てられた装置の平面図である。

第2図はこの発明のフィルターを含む装置の態様を示し、この場合2以上のプラスチック形が溶着されて内部室を有する1つの装置が形成される。図中aは側面図であり、bは溶着後の1つの装置の平面図である。

第3図は、反応室への分離された血漿の通過のための多数の通路を有するこの発明のフィルターを含む装置の平面図である。

図中、10は上部スライド、
20は中間スライド、
30は底部スライド、
12は入口部、
22はフィルター室、
14及び24は両面粘着テープ、
26aは毛管、
26bは反応室、
26cは排出口、

をそれぞれ示す。

特許出願人

バイオトラック,
インコーポレイティド

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗
弁理士 石 田 敬
弁理士 福 本 積
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也

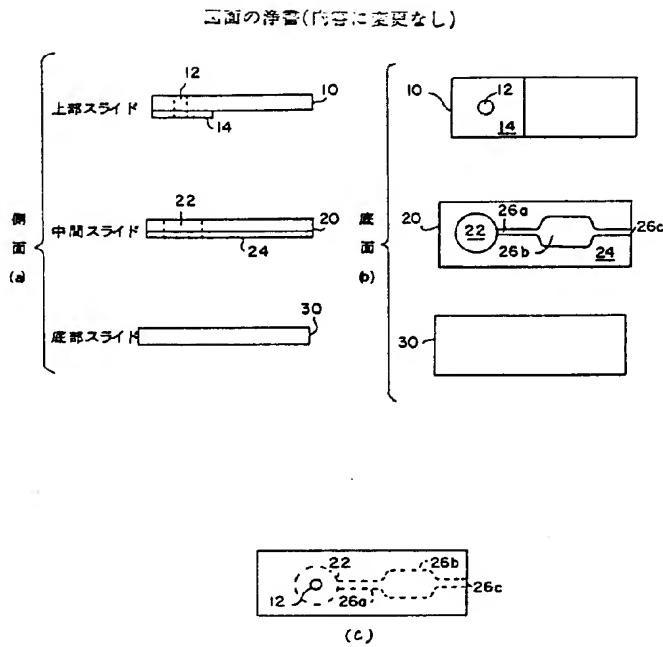


FIG. 1

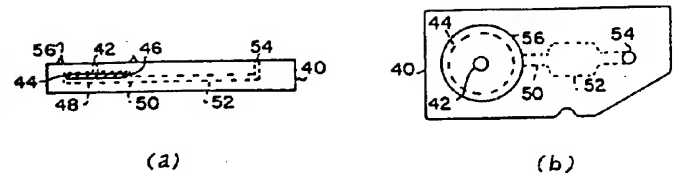


FIG. 2

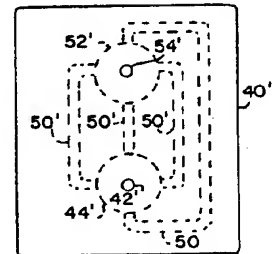


FIG. 3

手続補正書(方式)

昭和63年2月5日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第270484号

2. 発明の名称

血液分離装置及び方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 バイオトラック、インコーポレイテッド

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青木 朗 (外4名) 青木 隆之 弁理士

5. 補正命令の日付

昭和63年1月26日(発送日)

6. 補正の対象

図面

7. 補正の内容

図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

浄書図面

1通

63.2.15